PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07K 5/078, C12P 1/04, C12R 1/01, A61K 38/05, C12N 1/20 // (C12P 1/04, C12R 1:01)

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 98/13375

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

2. April 1998 (02.04.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/05095

(22) Internationales Anmeldedatum:

17. September 1997 (17.09.97)

(30) Prioritätsdaten: 196 38 870.8

23. September 1996 (23.09.96)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOTECHNOLOGISCHE GESELLSCHAFT FÜR FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). SASSE, Florenz [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). STEIN-METZ, Heinrich [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).
- (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR. GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

- (54) Title: COMPOUNDS WITH ANTIMYCOTIC AND CYTOSTATIC EFFECT, PREPARATION METHOD, AGENT CONTAINING THESE COMPOUNDS AND DSM 11 092
- (54) Bezeichnung: VERBINDUNGEN MIT ANTIMYKOTISCHER UND CYTOSTATISCHER WIRKUNG, HERSTELLUNGSVER-FAHREN, MITTEL UND DSM 11 092

Tubulysin A

(57) Abstract

The invention relates to chemical compounds having antimycotic and cytostatic effect, a method for their preparation from archangium gephyra strain DSM 11 092, agent containing these compounds and said strain.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, ein Verfahren zu ihrer Gewinnung aus dem Archangium gephyra-Stamm DSM 11 092, Mittel mit den Verbindungen und dem Stamm.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	I.T	Litauen	SK	Slowakei
AT	Osterreich	FR	Frankreich	LU	1_uxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Helgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Paso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	(L	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	18	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ.	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ΥL	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbahwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumanien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 98/13375 PCT/EP97/05095

Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, Herstellungsverfahren, Mittel und DSM 11 092

Gemäß einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Formel

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Formel

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel $C_{43}H_{65}N_5O_{10}S$ und mit den folgenden Parametern:

¹H-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

13C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

UV-Spektrum (Methanol) lambda_{max} (log epsilon): 225 (4,20), 250 (3,86) und 280 (3,20);

IR-Spektrum (KBr) ny: 3390, 2959, 2934, 2876, 1747, 1667, 1553, 1515 und 1233 cm^{-1} .

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel $C_{42}H_{63}N_5O_{10}S$ und mit den folgenden Parametern

1_{H-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);}

13_{C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);}

UV-Spektrum (Methanol) lambda_{max} (log epsilon): 225 (4,23), 250 (3,91) und 280 (3,26);

IR-Spektrum (KBr) ny: 3421, 2964, 2935, 2878, 1742, 1667, 1550, 1517 und 1235 $\,\mathrm{cm}^{-1}$.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindung der Summenformel $C_{41}H_{61}N_5O_{10}S$ und mit einem R_t -Wert (HPLC) unter folgenden Bedingungen:

Säule: Nucleosil 100 C-18, 7 μ m, 125 x 4 mm;

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH

5,0) + 10 mM Natriumdodecylsulfat;

Fluß: 1 ml/min;

Detektion: Diodenarray.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytotoxischer Wirkung, dadurch gewinnbar, daß man

- (a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und
- (b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und
- (c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und
- (d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,
- (e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm
- (e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,
- (f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,

- 4 -

PCT/EP97/05095

(g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und

(h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

Diese Verbindungen können dadurch gewinnbar sein, daß man bei Stufe (e) an einer C_{18} -Umkehrphase chromatographiert.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von chemischen Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man

- (a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und
- (b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und
- (c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und
- (d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,
- (e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm
- (e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,

- (f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,
- (g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und
- (h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein antimykotisches Mittel mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen Verbindung.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein cytostatisches Mittel mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen Verbindung.

Schließlich betrifft eine Ausführungsform der Erfindung Archangium gephyra DSM 11 092.

Nachstehend wird die Erfindung durch experimentelle Angaben und 3 Figuren (Strukturformeln) näher erläutert.

A. Produktionsbedingungen

A.1. Produktionsstamm

Das Bakterium Archangium gephyra gehört zur Ordnung der Myxococcales (Myxobakterien), Unterordnung Cystobacterineae, Familie Archangiaceae. Der Produktionsstamm Archangium gephyra Ar 315 wurde im Februar 1973 von Dr. Reichenbach aus einer Probe von einem Komposthaufen im Botanischen Garten in Freiburg, Deutsch-

land, isoliert. Er wurde 1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) unter der Nr. DSM 11 092 hinterlegt.

A.2. Stammkultur

Die Stammhaltung erfolgt auf Agarplatten, bevorzugt auf Hefe-Agar (VY/2-Agar). Dieses Medium enthält 0,5 % Bäckerhefe, 0,1 % $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0,1 $\mu g/l$ Cyanocobalamin und 1,2 % Agar. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Das Medium wird durch Autoklavieren sterilisiert. Die Plattenkulturen werden bei 30 °C bebrütet.

A.3. Morphologische Beschreibung

Die vegetativen Zellen sind lange, schlanke Stäbchen, etwa 6 bis 9 μ m lang und 0,8 μ m dick. Bedingt durch die Gleitbewegung der Bakterien, breiten sich die Kolonien rasch über die Kulturplatte aus. Die Schwarmkolonie auf Hefeagar ist dünn, filmartig, rötlich braun. Wie an dem um die Kolonien entstehenden Klärhof zu erkennen, werden die Hefezellen im Medium abgebaut. Auf diesem Medium bildet der Stamm oft blaßbräunliche Fruchtkörper, die aus mäandrierenden Wülsten aufgebaut sind und stark lichtbrechende Myxosporen enthalten. Letztere sind kurze, dicke, etwas unregelmäßige Stäbchen, etwa 2,5 bis 4 mm lang und 1,2 bis 1,8 mm dick.

A.4. Leistungen

Der Stamm Ar 315 produziert Substanzen, nämlich Tubulysine, die das Wachstum von Pilzen, humanen Krebszellen und anderen tierischen Zellkulturen hemmen. Die Hemmstoffe können sowohl aus den Zellen wie auch aus dem Kulturüberstand isoliert werden.

A.5. Produktion der Tubulysine

Die Substanzen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Fermen-

PCT/EP97/05095

tation verläuft wie folgt: Ein Fermentor mit 350 l Arbeitsvolumen wird mit 300 l Kulturmedium gefüllt (Zusammensetzung: 0,5 % Probion (Einzellerprotein der Fa. Hoechst); 1,0 % Stärke (Cerestar Krefeld); 0,2 % Glucose; 0,1 % Hefeextrakt; 0,1 % MgSO₄ x 7H₂O; 0,1 % CaCl₂ x 2H₂O; 0,1 μ g/l Cyanocobalamin; Alternativen zu Probion sind Sojamehl oder Maiskleber). Der pH-Wert wird mit KOH auf 7,4 eingestellt. Zur Bindung der ins Medium freigesetzten Hemmstoffe wird dem Medium 1 % (V/V) eines Adsorberharzes (Amberlite XAD-16, Rohm & Haas) zugesetzt. Beimpft wird mit 10 l einer 3 Tage alten Vorkultur, die im gleichen Medium in einem entsprechend kleineren Fermentor erzeugt wurde. Fermentiert wird bei 30 °C mit einer Rührgeschwindigkeit von 150 U/min und einer Belüftungsrate von 10 Vol.-% pro min. Anfängliche Schaumbildung wird durch Zugabe von 50 ml Silikon-Antischaum (z. B. Tegosipon, Goldschmidt AG, Essen) verhindert. Der pH-Wert steigt im Laufe der Fermentation an. Der Anstieg wird durch Zugabe von 5-proz. Schwefelsäure auf 7,8 begrenzt. Die Fermentation wird nach 5 Tagen beendet.

B. Isolierung von Tubulysin A, B und C

Das Adsorberharz wird in einem Prozeßfilter (0,7 m², 100 Maschen (mesh)) von der Kultur abgetrennt, und mit 15 l Methanol im Verlauf von 3 h eluiert. Die Konzentration des Eluates erfolgt unter Vakuum bis zum Auftreten der Wasserphase, die anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert wird. Nach Einengen der organischen Phase im Vakuum bei 30 °C Badtemperatur erhält man 36 g Rohextrakt.

Dieser Rohextrakt wird durch LH-20-Gelchromatographie (Säule: d = 20 cm, l = 100 cm, Fluß 45 ml/min, Detektion 226 nm) mit dem Laufmittel Methanol nach UV-Banden in 6 Fraktionen aufgetrennt, wobei Tubulysin A, B und C in der 2. Fraktion von 110 bis 130

min enthalten sind. Nach Einengen der betreffenden Fraktion trennt man in 3 Portionen auf einer Eurosil-Bioselect (100-20-C-18)-Säule (d = 4 cm, l = 48 cm) mit dem Laufmittel Methanol/0,05 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 7,0) = 60/40 und éinem Fluß von 8 ml/min. Die Detektion erfolgt bei 226 nm. $R_{\rm t}$ Tubulysin C 245 bis 260, Tubulysin B 260 bis 285 min, Tubulysin A 300 bis 320 min.

Nach Eindampfen der vereinigten Tubulysin A, Tubulysin B und Tubulysin C enthaltenen Fraktionen bis zur Wasserphase extrahiert man mit Ethylacetat und erhält nach dem Eindampfen im Vakuum und Trocknen 420 mg Tubulysin A, 240 mg Tubulysin B und 20 mg Tubulysin C.

Tubulysin A

 $C_{43}H_{65}N_{5}O_{10}S \ [843]$ $DCI-MS \ (positiv-Ionen): 844.4543 \ f\"{u}r \ [M+H]^+$ $^1H- \ und \ ^{13}C-NMR \ siehe \ Tabellen 1 \ und 2$ $UV \ (Methanol) \ lambda_{max} \ (log \ epsilon) = 225 \ (4.20); \ 250 \ (3.86); \\ 280 \ (3.30)$ $IR \ KBr: \ ny = 3390; \ 2959; \ 2934; \ 2876; \ 1747; \ 1667; \ 1553; \ 1515; \\ 1233 \ cm^{-1}$ $DC: \ R_f = 0.27$ $DC-Alufolie \ 60 \ F_{254} \ Merck. \ Laufmittel: \ Dichlormethan/Methanol = 9:1$ $Detektion: \ UV-L\"{o}schung \ bei \ 254 \ nm$ $HPLC: \ R_t = 9.7 \ min$ $S\"{a}ule: \ Nucleosil \ 100 \ C-18 \ 7 \ \mu m, \ 125 \ x \ 4 \ mm$ $Laufmittel: \ Methanol/Wasser = 70/30 \ + \ 2mM \ Ammoniumacetat \ (pH \ 5.0) \\ + 10 \ mM \ Natrium-dodecylsulfat$

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

WO 98/13375 PCT/EP97/05095

- 10 -

Tubulysin B

 $C_{42}H_{63}N_5O_{10}S$ [829]

DCI-MS (positiv-Ionen): 830.4361 für [M+H] +

¹H- und ¹³C-NMR siehe Tabellen 1 und 2

UV (Methanol) lambda_{max} (log epsilon) = 225 (4.23); 250 (3.91); 280 (3.26)

IR KBr: ny = 3421; 2964; 2935; 2878; 1742; 1667; 1550; 1517; 1235 cm^{-1}

DC: $R_f = 0.25$

DC-Alufolie 60 F_{254} Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =

9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm

HPLC: $R_t = 7.3 \text{ min}$

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μm , 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5.0)

+ 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

WO 98/13375 PCT/EP97/05095

- 11 -

Tubulysin C

 $C_{41}H_{61}N_5O_{10}S$ [815]

ESI-MS (positiv-Ionen): 816.6 für [M+H]

HPLC: $R_t = 6.8 \text{ min}$

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μ m, 125 x 4 mm.

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5,0)

+ 10 mM Natrium-dodecylsulfat

Fluß: 1 ml/min

Detektion: Diodenarray

Tabelle 1 ¹H-NMR data of tubulysines in [D₆] DMSO (600 MHz)

Н	Tub δ _H	ulysin A m	J[Hz]	Tu δ _H	bulysin m	B J[Hz]
2.11			J[112]	2.39		J(112)
2-H	2.37	m	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	 	m	
3-H _a	1.57	m	·	1.55	m	
3-H _b	1.83	m	_	1.82	m	
4-H	4.10	m		4.11	m	
5-H	7.88	d	7.5	7.76	d	9.0
8-H	8.18	S		8.17	S	
11-H	5.74	dd	11.3, 1.4	5.75	dd	11.2, 1.6
12-H _a	2.09	m		2.08	m	
12-H _b	2.36	m		2.36	m	
13-H	4.35	m		4.35	m	
16-H	4.40	dd	9.0, 8.8	4.42	dd	9.0, 8.8
17-H	7.92	d	8.8	7.88	d	8.6
19-H	2.46	dd	7.6	2.47	m	
20-H _a	1.42	m		1.42	m	
20-H _b	1.51	m ·		1.52	m .	
21-H _a	1.15	dd	12.5	1.16	m	
21-H _b	1.62	m	12.6	1.62	m	
22-H _a	1.36	m		1.38	m	
22-H _b	1.53	m		1.53	m	
23-H _a	1.94	m		1.93	m	
23-H _b	2.82	d d	11.4	2.83	d d	11.3
25-H ₃	2.04	s		2.05	s	
26-H ₃	1.04	d	7.0	1.05	d	7.0
27-H _a	2.66	m		2.68	m	
27-H _b	2.73	m		2.71	m	
29-H	6.96	d	8.4	6.96	d	8.4
30-H	6.61	d	8.4	6.62	d	8.3

32-H	6.61	d	8.4	6.62	d	8.3
33-H	6.96	d	8.4	6.96	d	8.4
35-H ₃	2.10	s		2.11	s	
36-H	1.82	m		1.84	m	
37-H ₃	0.67	d	6.5	0.68	d	6.6
38-H ₃	0.97	d	6.5	0.97	d	6.4
39-H _a	5.26	d	12.0	5.27	d	12.0
39-H _b	6.19	d	12.0	6.20	d	12.0
40-H	1.93	m		1.95	m	
41-H _a	1.08	m		1.10	m	
41-H _b	1.49	' m		1.49	m	
42-H ₃	0.81	t	7.5	0.80	t	7.4
43-H ₃	0.81	d	7.1	0.80	d	7.0
2'-H _a	2.13	m		2.15	m	
2'-H _b	2.15	m		2.18	m	
3'-H _a	1.92	m		1.48 1.50	m m	
3'-H _b	-			 		7.0
4'-H ₃	0.82	<u>d</u>	6.9	0.82	<u>t</u>	7.0
5'-H ₃	0.81	d	6.8	<u> </u>		

-14- Tabelle 2 13 C-NMR data of tubulysines in [D₆] DMSO (600 MHz)

	Tubulys	sin A	Tubulysi	n B
С	$\delta_{\rm c}$	m	$\delta_{\rm c}$	m
1	177.1	S	177.0	s
2	36.2	d	36.0	d
3	37.6	t	37.6	t
4	49.0	d	48.9	d
6	159.7	S	159.7	S
7 .	149.8	S	149.7	s
8	124.2	d	124.1	s
10	168.5	S	168.7	S
11	68.8	d	69.0	d
12	34.3	t	34.4	t
13	55.8 *	d	55.6 *	d
15	174.2	S	174.2	S
16	52.6	d	52.6	d
18	172.8	s	172.8	S
19	68.1	d	68.0	d
20	24.8	t	24.8	t
21	22.8	t	22.7	t
22	29.6	t	29.5	t
23	54.7	t	54.6	t
25	43.8	q	43.7	q
26	18.0	q	17.9	q
27	39.5	ı	39.4	t
28	128.5	s	128.4	S
29	129.9	đ	129.9	d
30	114.9	d	114.9	d
31	155.5	S	155.5	S
32	114.9	d	- 114.9	d

33	129.9	d	129.9	d
34	169.8	S	169.7	S
35	20.5	q	20.4	q
36	30.0	d	30.0	d
37	19.3	q	19.3	q
38	20.2	q	20.2	q
39	68.9 *	t	68.9 *	t
40	35.1	d	35.1	d
41	24.1	t	24.0	t
42	10.0	q	10.0	q
43	15.3	q	15.3	q
1'	171.3	S	171.8	S
2'	42.7	t	35.5	t
3'	25.0	d	17.6	t
4'	22.0	q	10.7	q
5'	22.0	q		

^{*}δ_C gemessen bei 80° C

C. Wirkung

Die Tubulysine haben eine cytostatische Wirkung auf Pilze, humane Krebszellinien und andere tierische Zellkulturen (vgl. Tabelle). Sie führen in den Zellen zu einem raschen Abbau des Mikrotubuli-Gerüsts. Das Aktinskelett bleibt erhalten. Adhärent wachsende L929-Maus-Zellen vergrößern unter dem Einfluß der Tubulysine ihr Zellvolumen, ohne sich zu teilen, und entwickeln große Zellkerne, die dann in einem apoptotischen Vorgang zerfallen.

Wirkungsspektrum

Pilze	Hemmh	of [mm]
	Tubulysin A	Tubulysin B
Aspergillus niger	20	18
Botrytis cinerea	23	18
Coprinus cinereus	20	
Pythium debaryanum	20	

Agardiffusionstest: 20 μg pro Testblättchen von 6 mm Durchmesser

Humane Krebszellinien		IC ₅₀ [ng/ml]			
	Tubulysin A	Tubulysin B	Tubulysin C		
KB-3-1 (DSM ACC 158)	0,01	0,02	0,1		
K-562 (ATCC CCL 243)	0,1	0,2	1,5		
HL-60 (ATCC CCL 240)	0,04	0,08	0,4		
Tierische Zellinien					
L929, Maus (ATCC CCL 1)	0,2	0,4	2		
Pt K2, Potorous tri- dactylis (ATCC CCL 56)	0,2	0,2	2		

Patentansprüche

1. Chemische Verbindung der Formel

2. Chemische Verbindung der Formel

3. Chemische Verbindung der Summenformel $\text{C}_{43}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{S}$ und mit den folgenden Parametern:

¹H-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

13C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin A);

UV-Spektrum (Methanol) lambda_{max} (log epsilon): 225 (4,20), 250 (3,86) und 280 (3,20);

IR-Spektrum (KBr) ny: 3390, 2959, 2934, 2876, 1747, 1667, 1553, 1515 und 1233 cm^{-1} .

4. Chemische Verbindung der Summenformel $C_{4\,2}H_{6\,3}N_5O_{1\,0}S$ und mit den folgenden Parametern

¹H-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

13C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1 (Tubulysin B);

UV-Spektrum (Methanol) lambda_{max} (log epsilon): 225 (4,23), 250 (3,91) und 280 (3,26);

IR-Spektrum (KBr) ny: 3421, 2964, 2935, 2878, 1742, 1667, 1550, 1517 und 1235 cm⁻¹.

5. Chemische Verbindung der Summenformel $C_{41}H_{61}N_5O_{10}S$ und mit einem R_t -Wert (HPLC) unter folgenden Bedingungen:

Säule: Nucleosil 100 C-18, 7 μ m, 125 x 4 mm;

Laufmittel: Methanol/Wasser = 70/30 + 2 mM Ammoniumacetat (pH 5,0) + 10 mM Natriumdodecylsulfat;

Fluß: 1 ml/min;

Detektion: Diodenarray.

- 20 -

- 6. Chemische Verbindungen mit antimykotischer und cytotoxischer Wirkung, dadurch gewinnbar, daß man
- (a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und
- (b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und
- (c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und
- (d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,
- (e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm
- (e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,
- (f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,
- (g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und
- (h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.

- 7. Chemische Verbindungen nach Anspruch 5, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (e) an einer C_{18} -Umkehrphase chromatographiert.
- 8. Verfahren zur Gewinnung von chemischen Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man
- (a) Archangium gephyra DSM 11 092 in einem wässrigen Kulturmedium mit einem Gehalt an Kohlenstoff-Quellen, Stickstoff-Quellen, Schwefel-Quellen, Cyanocobalamin und Mineralsalzen aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert und
- (b) das Adsorberharz vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol eluiert und vom Eluat das Methanol abzieht und
- (c) die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und einen Rohextrakt gewinnt und
- (d) den Rohextrakt einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft und ein oder mehrere Fraktionen mit einem Gehalt an Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung im UV bei 226 nm detektiert, abtrennt und einengt,
- (e) das gewonnene Konzentrat an einer Umkehrphase mit Methanol Ammoniumacetat-Puffer chromatographiert und durch Detektion im UV bei 226 nm
- (e1) eine Fraktion mit einer rascher laufenden Verbindung sowie; zeitlich getrennt,
- (e2) eine Fraktion mit einer langsamer laufenden Verbindung sowie, zeitlich getrennt,
- (e3) eine Fraktion mit einer noch langsamer laufenden Verbindung abtrennt,
- (f) von der gemäß (e1) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt,
- (g) von der gemäß (e2) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt und

- (h) von der gemäß (e3) gewonnenen Fraktion das Methanol abzieht, die zurückbleibende Wasserphase mit Ethylacetat extrahiert, eindampft und trocknet und die Verbindung gewinnt.
- 9. Antimykotisches Mittel mit einem Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.
- 10. Cytostatisches Mittel mit einem Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.
- 11. Archangium gephyra DSM 11 092.

Tubulysin A

Tubulysin B

Tubulysin C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 97/05095

A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C07K5/078 C12P1/04 C12 //(C12P1/04,C12R1:01)	2R1/01	A61K38/05	C12N1/20
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both national	il classification s	ind IPC	
	SEARCHED			
Mintmum do IPC 6	cumentation searched (classification system followed by c CO7K C12P C12N	lassification syn	nbols)	
Documental	tion searched other than minimum documentation to the ext	ient that such do	ocuments are included in t	he fields searched
Electronic d	ata base consulted during the international search (name o	ona sead alab to	1, where practical, search	terms used)
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate,	of the relevant	passages	Relevant to claim No.
Α	WO 93 13094 A (BIOTECHNOLOG GMBH) 8 July 1993	FORSCHU	NG	
Α	F. SASSE ET AL: "Gephyronic inhibitor of Eukariotic professor from Archangium gephyra" THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, vol. 48, no. 1, 1995, pages 21-25, XP002051795			
Funt	ther documents are listed in the continuation of box C.	X	Patent family member	are listed in annex.
"A" docume consider the consideration that consideration the consideration that consideration the consideration that consideration that consideration the consideration that consideration tha	ent which may throw doubts on pnority claim(s) or is cited to establish the publication date of another in or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means ent published prior to the international filling date but han the pnority date claimed actual completion of theinternational search	-X* (or priority date and not in- cited to understand the priority of the priority of document of particular rele- cannot be considered not involve an invertilive step of document of particular rele- cannot be considered to it document is combined with ments, such combination in the art.	
1	3 January 1998		26/01/1998	
Name and r	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Cervigni, S	·

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 97/05095

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9313094 A	08-07-93	DE 4142951 C AU 3257793 A	13-05-93 28-07-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen PCT/EP 97/05095

A. KLASSI IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES C07K5/078 C12P1/04 C12R1/03 //(C12P1/04,C12R1:01)	1 A61K38/05 C12	N1/20
Nach der in	ternationalen Patentklassälkation (IPK) oder nach der nationalen Kla	ssriikation und der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE		
Recherchies IPK 6	rter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbo CO7K C12P C12N	oba)	
Recherchie	rle aber nicht zum Mindestprufstoff gehörende Veröffentlichungen, so	weit diese unter die recherchieden Gebie	te fallen
Während de	ar internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (N	lame der Datenbank und evti. verwendet	e Suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angab	e der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 93 13094 A (BIOTECHNOLOG FORSO GMBH) 8.Juli 1993	CHUNG	
Α	F. SASSE ET AL: "Gephyronic acide inhibitor of Eukariotic protein sof from Archangium gephyra" THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, Bd. 48, Nr. 1, 1995, Seiten 21-25, XP002051795	d, a novel synthesis	·
	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
2 Besonders "A" Veröffer aber in "E" älteres Anmeil "L" Veröffer schein anders soll od ausge "O" Veröffer eine B "P" Veröffer dem b Datum des A	a Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : ntlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Dökument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen idedatum veröffentlicht worden ist ntlichung, die geeignat ist, einen Prioritätsanspruch zweifefhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ein im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden ler die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	T* Spätere Veröffentlichung, die nach de oder dem Prioritätsdatum veröffentlich Anmeldung nicht kollidiert, sondern in Erlindung zugrundeliegenden Prinzig Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bed kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung von besonderer Bed kann nicht als auf erfinderischer Tättle werden, wenn die Veröffentlichungen überer Kategorie diese Verbindung für einen Fachmar "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselb Absendedatum des internationalen F	tht worden ist und mit der ur zum Verständnis des der en oder der ihr zugrundellegenden eutung; die beanspruchte Erfindung tilchung nicht als neu oder auf trachtet werden eutung; die beanspruchte Erfindung gkeit beruhend betrechte! ill einer oder mehreren anderen in verbindung gebracht wird und en nahellegend ist en Patentfamilie ist
	3. Januar 1998 Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	26/01/1998 Bevoltmächtligter Bediensteter	
	Europálaches Paterntami, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL ~ 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Cervigni, S	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzelchen
PCT/EP 97/05095

	die zur selben Patentiamilie geho		PCT/EP 97/05095		
im Recherchenbericht geführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) de Patentiamilie	er	Datum der Veröffentlichung	
WO 9313094 A	08-07-93	DE 4142951 AU 3257793	C A	13-05-93 28-07-93	